

权 利 要 求 书

1. 枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变,其特征是枯草杆菌碱性蛋白酶第118位位点上门冬酰胺被丝氨酸取代,Asn(118)Ser;
2. 按权利要求1所述的枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变,其特征在于突变后DNA序列为:

10	20	30	40	50	60
GTGAGAAGCA	AAAAATTGTG	GATCAGCTTG	TTGTTTGGCT	TAACGTTAAT	CTTTACGATG
GCGTTCAGCA	ACATGTCTGC	GCAGGCTGCC	GGAAAAAGCA	GTACAGAAAA	GAAATACATT
GTTGGATTTA	AACAGACAAT	GAGTGCCATG	AGTTCGCGCA	AGAAAAAGGA	TGTTATTTCT
GAAAAAGGCG	GAAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	ACGCGGCCCG	AGCAACATTG
GATGAAAAAG	CTGTAAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATGT	GGAAGAAGAT
CATATTGCAC	ATGAATATGC	GCAATCTGTT	CCTTATGGCA	TTTCTCAAAT	TAAAGCGCCG
GCTCTTCACT	CTCAAGGTTA	CACAGGCTCT	AACGTAAAAG	TAGCTGTTAT	CGACAGCGGA
ATTGACTCTT	CTCATCCTGA	CTTAAACGTC	AGAGGCGGAC	GAAGCTTCGT	ACCTTCTGAA
ACAAACCCAT	ACCAGGACGG	CAGTTCTCAC	GGTACGCATG	TAGCCGGTAC	GATTGCCGCT
CTTAATAACT	CAATCGGTGT	TCTGGGCGTA	CGGCCAAGCG	CATCGTTATA	TGCAGTAAAA
GTGCTTGATT	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGGATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC
ATTTCACA	GTATGGATGT	TATCAACATG	AGCCTTGGCG	GACCTACTGG	TTCTACAGCG
CTGAAAACAG	TCGTTGACAA	AGCCGTTTCC	AGCGGTATCG	TCGTTGCTGC	CGCAGCCGGA
AACGAAGGTT	CATCCGGAAG	CACAAGCACA	GTCGGCTACC	CTGCAAAATA	TCCTTCTACT
ATTGCAGTAG	GTGCGGTAAA	CAGCAGCAAC	CAAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT
GAGCTTGATG	TGATGGCTCC	TGGCGTGTC	ATCCAAAGCA	CACTTCCTGG	AGGCACTTAC
GGCGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGGCGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	AGCGTTAATT
CTTTCTAAGC	ACCCGACTTG	GACAAACGCG	CAAGTCCGTG	ATCGTTTAGA	AAGCACTGCA
ACATATCTTG	GAAACTCTTT	CTACTAIGGA	AAAGGGTTAA	TCAACGTACA	AGCAGCTGCA
CAATAA					

3. 第118位突变的枯草杆菌碱性热稳定蛋白酶，其特征在于其氨基酸序列为：

AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGRSF
VPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVRPSASLYAVKVLDSTG
SGQYSWIINGIEWAISNSMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVA
AAAGNEGSSGSTSTVGYPKYPSTIAVGAVNSSNQRAFSSAGSELDYNA
PGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRDRL
ESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ

枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变及其热稳定酶

本发明涉及枯草杆菌碱性蛋白酶,特别是Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶第118位上的突变及由此产生的热稳定性高的蛋白酶。

枯草杆菌碱性蛋白酶属于丝氨酸酶,它水解蛋白质时对氨基酸种类的专一性较小,具有广谱性。作为洗涤剂的组份之一,已用于制革工业和清洗蛋白质一类的污渍。但是天然的碱性蛋白酶加热易失活,与漂白剂不能共存,影响了它的使用价值,国外对多种不同来源的碱性蛋白酶用基因工程和蛋白质工程手段进行了大量研究,得到了多种优良的突变种,其中有抗氧化的,耐热的,还有改变了表面电荷以改变与底物的相互作用而改良洗涤效果的突变种。在国内除了根据国外已有的报道在已知位点上作了某些定点突变外,还没有在未知位点上进行突变而得到性能改良的蛋白酶突变种。

丹麦诺沃公司的专利技术W08906279和W09100345分别描述了通过删除、取代或插入等方法,在枯草杆菌蛋白酶的单个或多个位点上,或进行氨基酸取代,或改变其表面电荷而得到不同位点的突变体,这些突变位点有第6,9,11-12,19,25,36-38,53-59,67,71,89,111,115,120,121-122,124,128,131,140,153,154等。中国专利申请号为90108892.7提供了枯草杆菌蛋白酶第123位和274位点的突变体,但上述发

明没有说明这些突变体的具体性能。

本发明目的在于提供枯草杆菌碱性蛋白酶第 118 位位点上的突变，在第 118 位点上，118 位门冬酰胺被丝氨酸取代，即 Asn(118)Ser，这种突变后的基因表达产物是一种与天然蛋白酶不同的，耐热性较天然蛋白酶好得多的蛋白酶，从而解决了天然碱性蛋白酶工业应用上作为洗涤剂组份之一，在制革和清洗蛋白质一类污渍工业中加热易失活的缺陷。

本发明用 PCR 方法对枯草杆菌碱性蛋白酶基因进行随机突变，筛选到一种突变体 Asn(118)Ser，它比天然碱性蛋白酶具有好得多的耐热性，用已经测得的天然蛋白酶的晶体结构进行计算机模拟，发现在 118 位 Ser 通过水分子与邻近的氨基酸相互作用对蛋白酶分子结构起稳定作用。

下面结合附图，以选用 Ki2 枯草杆菌碱性蛋白酶基因作为实施例，详细描述枯草杆菌碱性蛋白酶第 118 位的突变及其突变后热稳定酶的制得过程：

本发明选用 Ki2 枯草杆菌碱性蛋白酶基因，包括上游调控区信号肽和导肽部分的基因片段为 1.9Kb，1.9Kb 的片段插入质粒 PUC-19 构成的重组质粒 PY。本发明的蛋白质工程工作从 PY 质粒开始，从 PY 质粒中将 1.9Kb 片段切出，插到 PBE-2 穿梭质粒（生物工程学报 7(3):224-229, 1991, 郭兴华等）中，从而使碱性蛋白酶基因在枯草杆菌中得到表达。

1. 附图 1 为含枯草杆菌蛋白酶的重组质粒 PBY，其图中单线

部分为PBE—2 (生物工程学报7(3). 224-229. 1991. 郭兴华等) 载体, 双线部分为蛋白酶基因片段, 箭头表示蛋白酶基因方向, 附图2为质粒PUB或PUA构建示意图, 附图3为PCR制备含突变的基因片段示意图, 附图4 为将含突变的基因片段插入含未经突变的基因上游部分的载体中示意图。

由图2知, 将图1中所示的 PBY用HindⅢ酶解, 得到(1), (2) 两个片段, 片段(1)是包含蛋白酶结构基因下游部分约 0.9Kb的片段, 片段(2)是包含全部载体和蛋白酶基因上游部分约 7Kb片段, 将片段(1)即0.9Kb片段插入PUC—18载体, 由于插入方向不同而得到质粒PUA或PUB。片段(2)即7Kb的大片段称为PBY', 留作以后步骤使用, 即与PCR得到的 HindⅢ片段连接以恢复蛋白的完整基因并构成表达质粒PBM;

2. 由图3知, PUA或PUB作为PCR的模板, (3)为M13的通用测序引物, 两个引物一个正向, 一个反向, 通过PCR方法, 经25个循环, 每一个循环条件是93℃1分钟, 52℃1分钟秒, 70℃1分钟10秒, 得到的PCR片段4, 再用HindⅢ酶解, 除去两头的引物部分, 并经凝胶电泳纯化得到PCR扩增的HindⅢ片段(5);

3. 由图4知, 将上述得到的PCR扩增的HindⅢ片段(2)、(5)插回到步骤2中的片段(2)即 7Kb的大片段也称PBY' 中, 得到重组表达质粒PBM, 由于PCR有1/400的错误机率, 所以此重组表达质粒 PBM是一混合物, 有突变的, 也有正常的, 有插入方向相同的, 也有插入方向相反的, 插入方向相反的使基因失去功能,

有的突变种也能使基因失去功能，只有那些插入方向相同的重组质粒能表达正常的碱性蛋白酶，在这些正常的蛋白酶中有的活性提高了，有的降低了，有的具有耐热性，有的则与天然酶一样。将重组质粒混合物PBM转化DB104受体菌，在牛奶平板上进行筛选，没有透明圈的是插入方向相反的和突变使基因失活的重组质粒的转化子。那些有透明圈的即是含有正常蛋白酶基因的或虽含突变但却没使基因失活的重组质粒的转化子。将这些含透明圈的转化子再逐个培养，逐个测定它们分泌的碱性蛋白酶的相对活性和热稳定性。从中选得一热稳定性显著增加的突变种Asn(118)Ser。

4. 选到的突变种经DNA 序列测定确定发生突变的核苷酸位置，从而知道哪个氨基酸发生了突变，附图5 为突变种和野生型基因在突变区附近的DNA序列，野生型是AAT，而突变种则是AGT，AAT是Asn的编码，AGT是Ser的编码，由图5知，突变种和野生型的DNA序列中仅有一个核苷酸的差别，A变为G。这一突变正好位于第118位Asn(门冬酰胺)的编码AAT中间的A，突变后的AGT变成了Ser(丝氨酸)的编码。所以本发明得到了在118位上突变了的碱性蛋白酶基因，这突变后的基因表达产物是一种与天然碱性蛋白酶不同的蛋白酶。它比天然酶具有好得多的耐热性，它将改善天然酶在工业和正常生活中的应用。附图6 为枯草杆菌碱性蛋白酶与枯草杆菌168碱性蛋白酶DNA序列比较示意图，图中带点处表示两者不同的地方。附图7为Ki2枯草杆菌碱性蛋

白酶与枯草杆菌168 碱性蛋的酶氨基酸序列的比较示意图，图中带点处表示两者不同的地方，附图10为突变后的Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶DNA序列，附图11为第118位突变的枯草杆菌碱性热稳定蛋白酶的氨基酸序列；附图8为野生型蛋白酶和118位突变后的Asn(118)Ser蛋白酶活性比较示意图，图中曲线A表示野生型蛋白酶活性随温度变化而变化的曲线，曲线 B 表示突变种Asn(118)Ser蛋白酶活性随温度变化而变化的曲线，由图中可以得出突变种Asn(118)Ser 蛋白酶热稳定性比野生型蛋白酶好得多，60℃失活半衰期比天然酶长3倍。

附图9为突变后的蛋白酶局部结构的立体对，图中“·”表示水分子，由图9 知，Ser(118)通过水分子和另外两个氨基酸构建三对氢键，使分子结构趋于稳定，从而使其蛋白酶的热稳定性得以提高。

本发明揭示了枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变，以及突变后的表达产物是一种热稳定性比天然碱性蛋白酶好得多的蛋白酶，这种酶是一种热稳定酶，本发明适用于枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的定点突变。

说明书附图

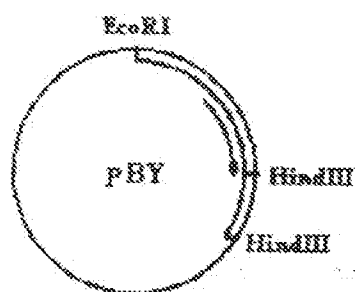


图 1

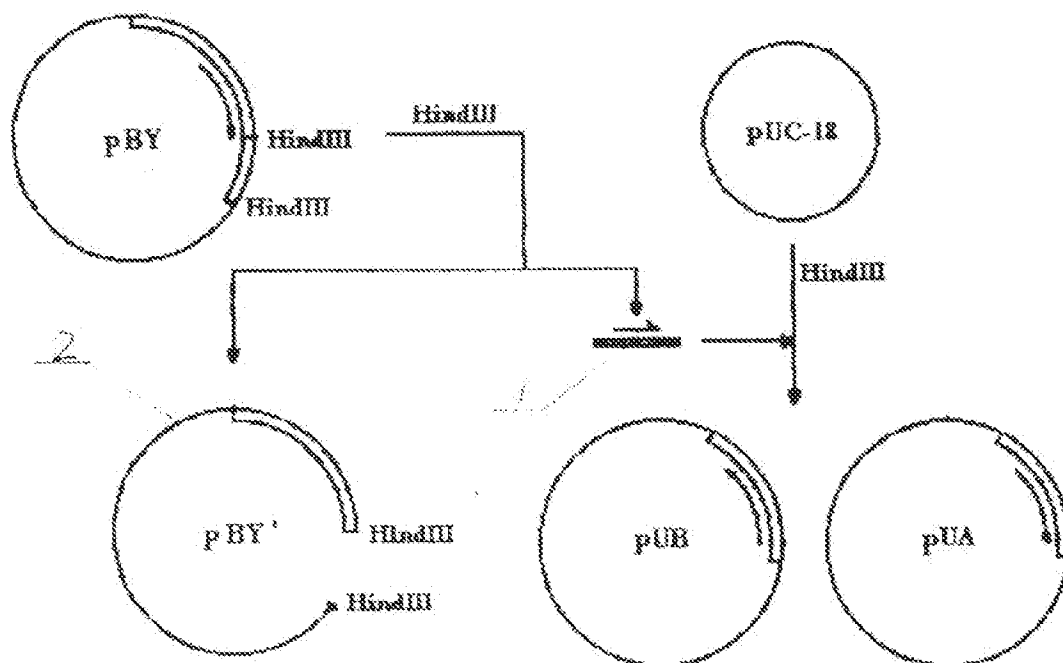


图 2

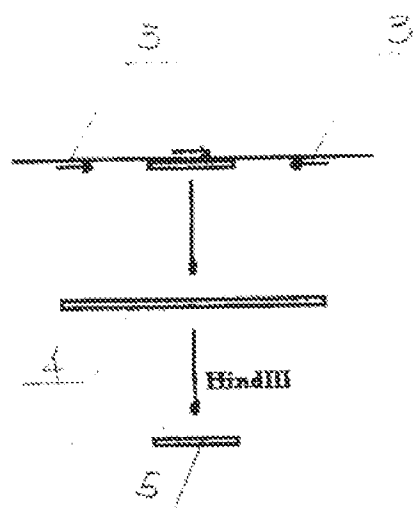


图 3

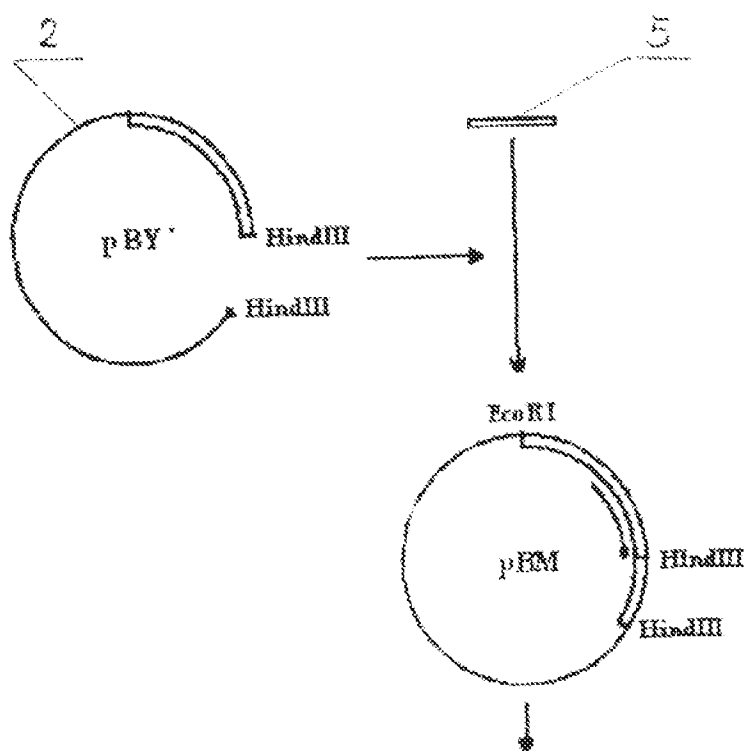


图 4

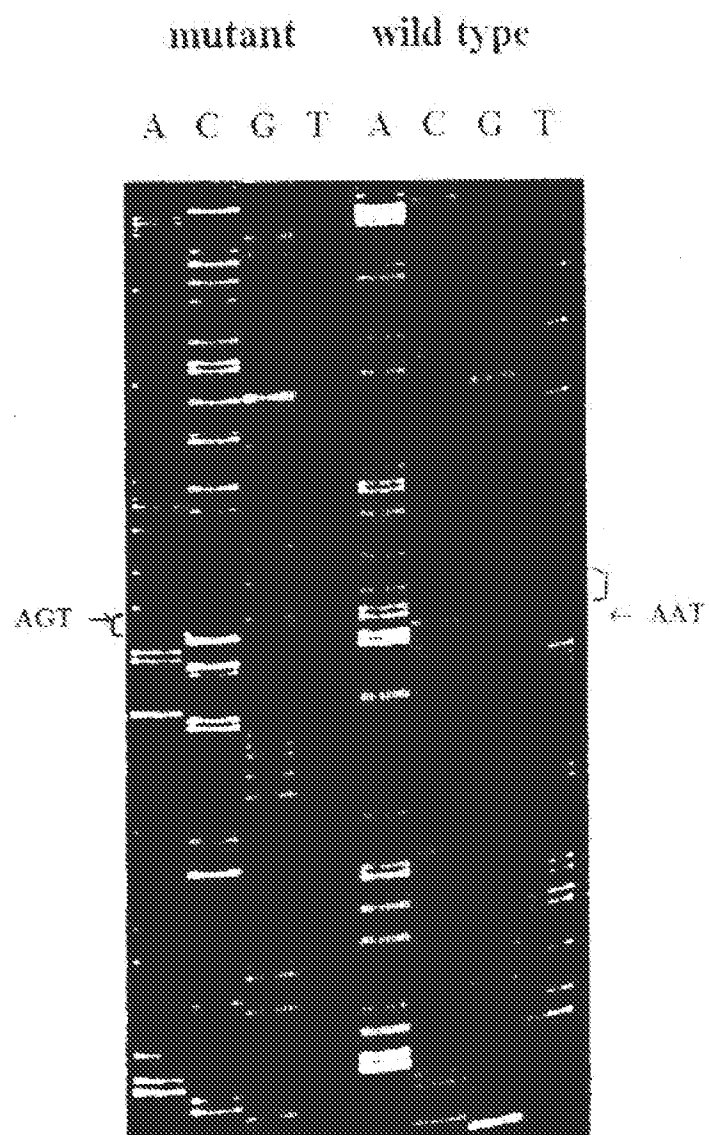


图 5

	10	20	30	40	50	60
168	GTGACAAGCA	AAAAATTGTG	GATCAGCTTG	TTGTTTGGCT	TAACGTTAAT	CTTTACGATG
K12	GTGACAAGCA	AAAAATTGTG	GATCAGCTTG	TTGTTTGGCT	TAACGTTAAT	CTTTACGATG
168	GCGTTCAGCA	ACATGTCTTC	GCAGGCTGCC	GGAAAAAGCA	GTACAGAAAA	GAAATACATT
K12	GCGTTCAGCA	ACATGTCTGC	GCAGGCTGCC	GGAAAAAGCA	GTACAGAAAA	GAAATACATT
168	GTCGGATTTA	AACAGACAAT	GAGTGCCATG	AGTTCGGCCA	AGAAAAAGGA	TGTTATTTCT
K12	GTTGGATTTA	AACAGACAAT	GAGTGCCATG	AGTTCGGCCA	AGAAAAAGGA	TGTTATTTCT
168	GAAAAAGGCG	GAAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	ACGCGGCCCG	AGCAACATTG
K12	GAAAAAGGCG	GAAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	ACGCGGCCCG	AGCAACATTG
168	GATGAAAAAG	CTGTAAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATGT	GGAAGAAGAT
K12	GATGAAAAAG	CTGTAAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATGT	GGAAGAAGAT
168	CATATTGCAC	ATGAATATGC	GCAATGTGTT	CCTTATGGCA	TTTCTCAAAT	TAAAGCGCCG
K12	CATATTGCAC	ATGAATATGC	GCAATGTGTT	CCTTATGGCA	TTTCTCAAAT	TAAAGCGCCG
168	GCTCTTCACT	CTCAAGGCTA	CACAGGCTCT	AACGTAAAAG	TAGCTGTTAT	CGACAGCGGA
K12	GCTCTTCACT	CTCAAGGTTA	CACAGGCTCT	AACGTAAAAG	TAGCTGTTAT	CGACAGCGGA
168	ATTGACTCTT	CTCATCCTGA	CTTAAACGTC	AGAGGCGGAG	CAAGCTTCGT	ACCTTCTGAA
K12	ATTGACTCTT	CTCATCCTGA	CTTAAACGTC	AGAGGCGGAC	CAAGCTTCGT	ACCTTCTGAA
168	ACAAACCCAT	ACCAGGACGG	CAGTTCTCAC	GGTACGCATG	TAGCCGGTAC	GATTGCCGCT
K12	ACAAACCCAT	ACCAGGACGG	CAGTTCTCAC	GGTACGCATG	TAGCCGGTAC	GATTGCCGCT
168	CTTAATAACT	CAATCGGTGT	TCTGGGCTTT	AGCCCAAGCG	CATCATTATA	TGCAGTAAAA
K12	CTTAATAACT	CAATCGGTGT	TCTGGGCTTT	CGGCCAAGCG	CATCGTTATA	TGCAGTAAAA
168	GTGCTTGATT	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGGATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC
K12	GTGCTTGATT	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGGATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC
168	ATTTCCAACA	ATATGGATGT	TATCAACATG	AGCCTTGGCG	GACCTACTGG	TTCTACAGCG
K12	ATTTCCAACA	ATATGGATGT	TATCAACATG	AGCCTTGGCG	GACCTACTGG	TTCTACAGCG
168	CTGAAAACAG	TCGTTGACAA	AGCCGTTTCC	AGCGGTATCG	TCGTTGCTGC	CGCAGCCGGA
K12	CTGAAAACAG	TCGTTGACAA	AGCCGTTTCC	AGCGGTATCG	TCGTTGCTGC	CGCAGCCGGA
168	AACGAAGGTT	CATCCGGAAG	CACAAACACA	GTGCGCTACC	CTGCAAAATA	TCCTTCTACT
K12	AACGAAGGTT	CATCCGGAAG	CACAAACACA	GTGCGCTACC	CTGCAAAATA	TCCTTCTACT
168	ATTGCAGTAG	GTGCGGTAAA	CAGCAGCAAC	CAAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT
K12	ATTGCAGTAG	GTGCGGTAAA	CAGCAGCAAC	CAAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT
168	GAGCTTGATG	TGATGGCTCC	TGGCGTGTCC	ATCCAAAGCA	CACCTTCTGG	AGGCACTTAC
K12	GAGCTTGATG	TGATGGCTCC	TGGCGTGTCC	ATCCAAAGCA	CACCTTCTGG	AGGCACTTAC
168	GCGGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGCGGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	AGCCTTAATT
K12	GCGGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGCGGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	AGCCTTAATT
168	CTTTCTAAGC	ACCCGACTTG	GACAAACGCG	CAAGTCCGTC	ATCGTTTAGA	AAGCACTGCA
K12	CTTTCTAAGC	ACCCGACTTG	GACAAACGCG	CAAGTCCGTC	ATCGTTTAGA	AAGCACTGCA
168	ACATATCTTG	GAAACTCTTT	CTACTATGGA	AAAGGGTTAA	TCAACGTACA	AGCAGCTGCA
K12	ACATATCTTG	GAAACTCTTT	CTACTATGGA	AAAGGGTTAA	TCAACGTACA	AGCAGCTGCA
168	CAATAA					
K12	CAATAA					

168 MRSKKLWISLLEFALTTLIFTMAFSNMSAQAAACKSSTEKKYIVGFKQTMSAMSSAKKKDVISEKGGKVQKQ
 K12 MRSKKLWISLLEFALTTLIFTMAFSNMSAQAAACKSSTEKKYIVGFKQTMSAMSSAKKKDVISEKGGKVQKQ

168 FKYNAAAAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYAQSPYGISQIKAPALHSQQYTGSNVVKVAVIDS
 K12 FKYNAAAAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYAQSPYGISQIKAPALHSQQYTGSNVVKVAVIDS

168 GIDSSHPDLNVRGGASFPSETNPYQDGGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVSPSASLYAVKVLDSTGSGQ
 K12 GIDSSHPDLNVRGGRSFPSETNPYQDGGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVSPSASLYAVKVLDSTGSGQ

168 YSWIINGIEWAISSNNMDVINMSLOGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPS
 K12 YSWIINGIEWAISSNNMDVINMSLOGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPS

168 TIAVGAVNSSNQRAFSFSSAGSELDVMAPOVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTN
 K12 TIAVGAVNSSNQRAFSFSSAGSELDVMAPOVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTN

168 AQVRDRLESTATYLGNSFYFGKCLINVQAAAQ
 K12 AQVRDRLESTATYLGNSFYFGKCLINVQAAAQ

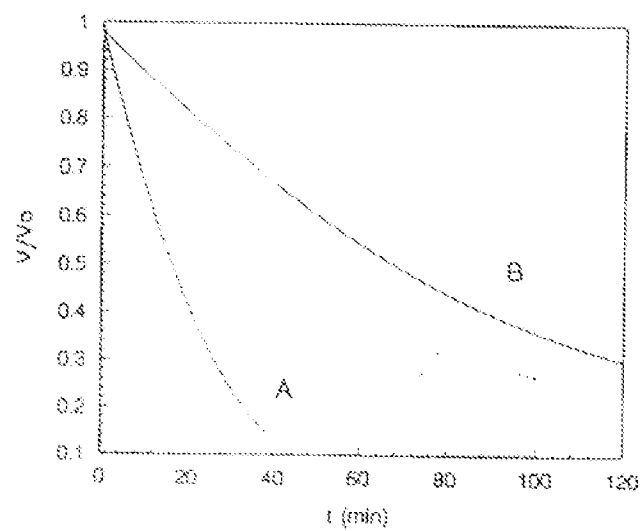


图 8

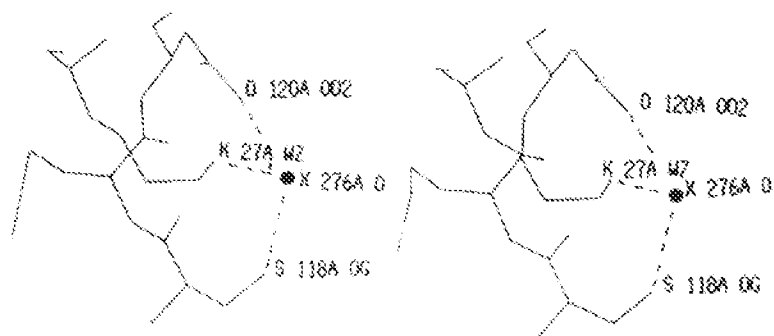


图 9

	10	20	30	40	50	60
CTGAGAGGCA	AAAAATTCTG	CATCAGCTTG	TTGTTGGCGT	TAACGTTAAT	CTTTACGATG	
GCCTTCAGCA	ACATGTCTGC	GCAGGCTGCC	GGAAAAAGCA	GTACAGAAAA	GAATATACATT	
GTTCGATTTA	AACAGACAAAT	GAGTGCATG	AGTTCCGCCA	AGAAAAAGGA	TGTTATTCT	
GA AAAAGCCG	GAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	ACGGGGCCCG	AGCAACATTG	
GATGAAAAAG	CTGTAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATCT	GGACAGACAT	
CATATTGCAC	ATGAATATCC	GCAATCTGTT	CCTTATGCCA	TTTCTCAAAAT	TAAAGCGCCG	
GCTCTTCAC	CTCAAGTTA	CACAGGCTCT	AACGTAAAG	TAGCTGTAT	CGACAGCGGA	
ATTGACTCTT	CTCATCTGA	CTTAAACGTC	AGAGGGCGAC	GAAAGTTCCG	ACCTTCTGAA	
ACAAACCCAT	ACCAGGACGG	CACTTCTCAC	GGTACGCCATG	TAGCCGGTAC	GATTTCGGCT	
CTTAATAACT	CAATCCGCTG	TCTGGCGGTA	GGGCCAAGCG	CATCGTTATA	TGCACATAAA	
GTCCTTGATT	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC	
ATTTCACA	CTATGCATG	TATCAACATG	AGCCTTGGCG	GACCTACTCG	TTCTACAGCG	
CTGAAAAACAG	TCCGTTGACAA	AGCCGTTTCC	AGCGGTATCG	TGGTTGCTGC	CCGAGCCGCA	
AACGAAAGTT	CATCCGGAG	CACAAGCACA	GTCGGCTACC	CTGCCAAATA	TCCCTTCTACT	
ATTGCAGTAG	GTCGGTAAA	CAGCAGCAAC	CAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT	
GAGCTTGATG	TGATGGCTCC	TGGCGTCTCC	ATCCAAAGCA	CACTTCTCTG	AGGCACTTAC	
GGCGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGGCGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	ACCGTTAATT	
CTTCTTAAGC	ACCCGACTTG	GACAAACGCG	CAAGTCCGTTG	ATCGTTTACA	AAAGCACTGCA	
ACATATCTTG	GAAACTCTTT	CTACTATGGA	AAAGGTTAA	TCAACGTACA	AGCAGCTGCA	
CAATPAA						

AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGRSF
VPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVRPSASLYAVKVLDSTG
SCQYSWIINGIEWAISNSMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVA
AAAGNEGSSGSTSTVGYPKYPSTIAVGAVNSSNQRAFSSAGSELDVMA
PGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRDRL
ESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ

18 11